

## PENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference <b>47440</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. <b>PCT/FI 99/00347</b>	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) <b>28 April 1999</b>	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) <b>29 April 1998</b>
Applicant <b>Savolainen, Jouko</b>		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1.  Certain claims were found unsearchable (See Box I).
2.  Unity of invention is lacking (See Box II).
3.  The international application contains disclosure of a nucleotide and/or amino acid sequence listing and the international search was carried out on the basis of the sequence listing
  - filed with the international application.
  - furnished by the applicant separately from the international application,
    - but not accompanied by a statement to the effect that it did not include matter going beyond the disclosure in the international application as filed.
    - transcribed by this Authority.
4. With regard to the title,  the text is approved as submitted by the applicant.
  - the text has been established by this Authority to read as follows:
5. With regard to the abstract,
  - the text is approved as submitted by the applicant.
  - the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.
6. The figure of the drawings to be published with the abstract is:
 

Figure No. ---

  - as suggested by the applicant.
  - because the applicant failed to suggest a figure.
  - because this figure better characterizes the invention.

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**IPC6: A23J 1/20, A23J 3/08, A23J 3/16, A23C 9/00, A23C 21/00**  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**IPC6: A23J, A23C**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

**SE,DK,FI,NO classes as above**

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**CAPLUS, FSTA**

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 9522907 A1 (SAVOLAINEN, JOUKO), 31 August 1995 (31.08.95) --	1-12
X	J. AGRIC. FOOD CHEM., Volume 43, 1995, Silvana Petruccielli et al, "Partial Reduction of Soy Protein Isolate Disulfide Bonds" page 2001 - page 2006 --	1-12
A	JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, Volume 37, No 5, 1989, Navin K.D. Kella et al, "Effect of Disulfide Bond Cleavage on Structural and Interfacial Properties of Whey Proteins" page 1203 - page 1210 --	1-12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

**2 August 1999**

Date of mailing of the international search report

**10 -08- 1999**

Name and mailing address of the ISA/  
 Swedish Patent Office  
 Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM  
 Facsimile No. + 46 8 666 02 86

Authorized officer  
**Eva Johansson/ELY**  
 Telephone No. + 46 8 782 25 00

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FI 99/00347

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF FOOD SCIENCE, Volume 55, No 6, 1990,    Juan M. Gonzalez et al, "Recovery of Protein from    Raw Sweet Whey Using a Solid State Sulfitolytic"    page 2 - page 6</p> <p>-----</p> <p>-----</p>	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

01/07/99

International application No.

PCT/FI 99/00347

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9522907 A1	31/08/95	AU 681250 B	21/08/97
		AU 1710095 A	11/09/95
		EP 0796047 A	24/09/97
		FI 96266 B,C	29/02/96
		FI 101514 B	00/00/00
		FI 940846 A	24/08/95
		FI 944110 A	24/08/95
		JP 9509320 T	22/09/97
		NZ 279847 A	19/12/97
		US 5834042 A	10/11/98

**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	IU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

# RECORD COPY

1/3

## PCT REQUEST

47440

Original (for SUBMISSION) - printed on 28.04.1999 12:00:30 PM

0-1	For receiving Office use only International Application No.	<b>PCT/FI 99 / 0 0 3 4 7</b>
0-2	International Filing Date	<b>28 APR 1999</b> (28.04.99)
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	The Finnish Patent Office PCT International Application
0-4 0-4-1	Form - PCT/RO/101 PCT Request Prepared using	<b>PCT-EASY Version 2.83 (updated 01.03.1999)</b>
0-5	<b>Petition</b> The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	<b>Receiving Office (specified by the applicant)</b>	<b>National Board of Patents and Registration (Finland) (RO/FI)</b>
0-7	<b>Applicant's or agent's file reference</b>	<b>47440</b>
I	<b>Title of Invention</b>	<b>METHOD FOR ISOLATION AND MODIFICATION OF PROTEINS</b>
II	<b>Applicant</b> This person is:	applicant and inventor
II-1	Applicant for	all designated States
II-4	Name (LAST, First)	SAVOLAINEN, Jouko
II-5	Address:	Kuurinniityntie 26 FIN-02750 Kauniainen Finland
II-6	State of nationality	FI
II-7	State of residence	FI
IV-1	<b>Agent or common representative; or address for correspondence</b> The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: Name	agent
IV-1-1	Address:	BERGGREN OY AB
IV-1-2		P.O. Box 16
IV-1-3	Telephone No.	FIN-00101 Helsinki
IV-1-4	Facsimile No.	Finland
IV-1-5	e-mail	+358-9-693701 +358-9-6933944 <a href="mailto:email.box@berggren.elisa.fi">email.box@berggren.elisa.fi</a>

## PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 28.04.1999 12:00:30 PM

V	Designation of States		
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	<b>EP: AT BE CH&amp;LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT</b>	
V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	<b>AU NZ US</b>	
V-5	<b>Precautionary Designation Statement</b> In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-6 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.		
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	<b>NONE</b>	
VI-1	<b>Priority claim of earlier national application</b>		
VI-1-1	Filing date	<b>29 April 1998 (29.04.1998)</b>	
VI-1-2	Number	<b>980945</b>	
VI-1-3	Country	<b>FI</b>	
VI-2	<b>Priority document request</b> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	<b>VI-1</b>	
VII-1	<b>International Searching Authority Chosen</b>	<b>Swedish Patent Office (ISA/SE)</b>	
VIII	<b>Check list</b>	number of sheets	electronic file(s) attached
VIII-1	Request	<b>3</b>	-
VIII-2	Description	<b>17</b>	-
VIII-3	Claims	<b>2</b>	-
VIII-4	Abstract	<b>1</b>	<b>47440.txt</b>
VIII-5	Drawings	<b>0</b>	-
VIII-7	<b>TOTAL</b>	<b>23</b>	

## PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION) - printed on 28.04.1999 12:00:30 PM

	Accompanying documents	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
VIII-8	Fee calculation sheet	✓	-
VIII-9	Separate signed power of attorney	✓	-
VIII-16	PCT-EASY diskette	-	diskette
VIII-17	Other (specified):	<b>Copy of official action in FI 980945.</b>	-
VIII-18	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
VIII-19	Language of filing of the international application	<b>Finnish</b>	
IX-1	Signature of applicant or agent	 <b>BERGGREN OY AB</b>	
IX-1-1	Name	<b>BERGGREN OY AB</b>	
IX-1-2	Name of signatory	<b>Ira Risku</b>	
IX-1-3	Capacity	<b>Patent Agent</b>	

## FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	<b>28 APR 1999</b>	( 28 -04- 1999 )
10-2	Drawings:		
10-2-1	Received		
10-2-2	Not received		
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported International application		
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)		
10-5	International Searching Authority	<b>ISA/SE</b>	
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid		

## FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	<b>( 26.05.99 )</b>	<b>26 MAY 1999</b>
------	--	---------------------	--------------------

## Menetelmä proteiinien eristämiseksi ja muuntemiseksi

5 Keksintö koskee menetelmää proteiinien eristämiseksi, erityisesti herasta tai soijasta ja eristettyjen proteiinien muuntemiseksi, saattamalla proteiinit, erityisesti hera tai soija tai sen konsentraatti, kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonoimiseksi.

10 Heraproteiinit ovat muihin proteiineihin nähden ravintoarvoltaan ylivoimaisia erityisesti lysiini- ja metioniinipitoisuutensa vuoksi. Heraproteiinien jalostus ihmusravinnoksi ja terveysvaikutteisiksi ravintotuotteiksi nostaisi heran jalostusarvoa ja lisäisi näin juustontuotannon kannattavuutta. Vaikka heraproteiinilla on hyvät käyttöedellytykset elintarvikeraaka-aineena, suurimpina esteinä sen käytölle ovat talteenotto-prosessien ja fraktioiden eristysprosessien kalleus sekä proteiinikonsentraattien ja 15 isolaattien vaihtelevat ja heikot toiminnalliset ominaisuudet, kuten huono liukoisuus, emulgoituvuus, geeliytyvyys ja vaahtoutuvuus.

20 Heran proteiinien eristämistä vaikeuttaa niiden hyvä liukoisuus, eikä siihen voida vaikuttaa pH:n muutoksella välillä pH 2-9 proteiinien ollessa natiivissa muodossa. Proteiineja voidaan eristää neljän päämenetelmän mukaisesti: 1. denatuointi kuumentamalla ja saostus, 2. ultrasuodatus, 3. ioninvaihto ja 4. kemiallinen muuntelu ja 25 saostus.

25 Yleisimmin tunnettu menetelmä heraproteiinien eristämiseksi on kuumennusdenatuointi ja pH:n laskeminen happamalle puolelle. Tällä menetelmällä saadaan proteiini, joka on menettänyt lähes kaikki tärkeimmistä toiminnallisista ominaisuuksistaan. Sitä käytetään pääasiassa erilaisissa levitteissä, esimerkiksi sulfatejuustoissa, osittain tai kokonaan korvaamaan juusto (Hill et al., Can. Int. Food Sci. Technol. J. 15 (1982), 155-160).

30 Nykyään heran proteiinit eristetään pääasiassa proteiinikonsentraattina käyttämällä ultrasuodatusta ja kuivausta tai proteiini-isolaattina käyttämällä ioninvaihtoadsorptiotekniikkaa ja kuivausta. Molemmilla menetelmillä on mahdollista saada eristetyt proteiinit toiminnallisina. Määräväänä tekijänä näiden tuotantomenetelmien valinnassa on saavutettava tuotteen toiminnallisuus ja tuotantokustannukset.

35 Edellä mainituilla menetelmillä aikaansaatujen proteiinikonsentraattien koostumukseissa, toiminnallisudessa sekä aistittavissa ominaisuuksissa esiintyy kuitenkin

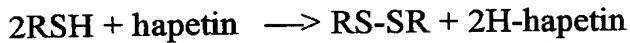
suurta vaihtelua ja sen vuoksi teollisuus vieroksuu niiden käyttöä. Vaihtelu johtuu käytettävän heran erilaisesta koostumuksesta ja esikäsittelyn sekä valmistus- ja kä-  
sittelyolosuhteiden erilaisuudesta.

5 Proteiini-isolaateissakin esiintyy edellä mainituista syistä eri ominaisuuksien vaih-  
telua. Niiden valmistuksessa käytetty ioninvaihtoadsorptiomenetelmä tasaa vaihtelua  
jonkin verran ja antaa koostumukseltaan erilaisen lopputuotteen kuin ultrasuodatuks-  
sella tuotettu proteiinikonsentraatti on. On havaittu, että isolaatit ovat selvästi laa-  
10 dukkaampia ja toiminnallisempia kuin konsentraatit proteiinin ja rasvan määrän  
suhteen sekä proteiinin liukoisuuden, vaahtoavuuden ja vaahdon pysyvyyden, pro-  
teiinin denaturoimattomuuden ja kokkareisuuden sekä maun ja hajun suhteen. Kon-  
sentraattien suhteellisen korkea laktoosi- ja mineraalipitoisuus sekä heikko maku ja  
haju ovat tekijöitä, jotka rajoittavat konsentraattien käyttöä elintarviketeollisuudessa.  
15 Heraproteiini-isolaattien käyttökelpoisuutta rajoittaa hyvistä ominaisuuksista huoli-  
matta valmistusmenetelmästä johtuva tuotteen korkea hinta.

Tunnettua on myös, että muuttamalla proteiinien rakennetta kemiallisella reaktiolla  
voidaan vaikuttaa molekyylin avaruusrakenteeseen/konformaatioon, varaukseen ja  
hydrofobisuuteen sekä siten proteiinin eräisiin muihinkin ominaisuuksiin, kuten liu-  
20 koisuuteen, viskositeettiin, vaahtoavuuteen ja emulgoituvuuteen.

Käytännöllisin ja yksinkertaisin kemiallinen menetelmä proteiinin molekyylin ra-  
kenteen muuntelussa on sulfonointi, tarkemmin tiolisulfonointi eli S-sulfonointi, jo-  
25 ka saadaan aikaan oksidatiivisella sulfitolyyssillä. Siinä proteiinien aminohappoketju-  
jen väliset rikkisillat eli disulfidisidokset aukaistaan, mikä saadaan aikaan lisäämällä  
sulfiitti-ioneja, jolloin käynnistyy hapetuspelekistysreaktio, jossa toinen rikki hapet-  
tuu sulfonaatiksi ja toinen pelkistyy sulfhydryyliryhmäksi.

Lisäämällä mukaan vielä hapettava tekijä hapettuvat vapaat sulfhydryyliryhmät jäl-  
30 leen disulfidisidoksiksi, jotka puolestaan jatkavat reaktiossa niin kauan, kunnes  
kaikki sulfhydryyliryhmät ovat sulfonoituneet tai reaktion jokin muu tekijä on muo-  
dostunut rajoittavaksi. Oksidatiivisen sulfitolyyzin periaate on kuvattu seuraavilla  
yhtälöillä:



10      Siinä RS-SR kuvaaa proteiinimolekyyliä, joka koostuu kahdesta aminohappoketjusta R, jolloin S-S on kahden aminohappoketjun välissä oleva disulfidisidos. Se yhdistää aminohappoketjut ja pitää niitä osaltaan lukittuna tiettyyn asentoon. Muunnellut proteiinimolekyyliit ovat saostettavissa liuoksesta laskemalla pH:ta sulfitolyyssireaktion pH:sta pH 3-5:een.

15      Oksidatiivista sulfitolyyssä on julkaisussa Kella, N. K. D. et al., J. Agr. Food Chem. 37, (1989), 1203-1210, käytetty heran proteiini-isolaattien molekyylien muunteluun tarkoituksena vaikuttaa proteiinien toiminnallisiin ominaisuuksiin, kuten liukoisuuteen, viskositeettiin, vaahtoavuuteen ja vaahdon pysyvyyteen. Ominaisuuksiin vai-  
kuttavana tekijänä oli disulfidisidosten vähentäminen suhteessa alkuperäisten disul-  
fidisidosten määrään. Tietyt ominaisuudet paranivat tai huononivat disulfidisidosten  
määrän vähetessä. Mm. liukoisuus huononi alle 5 %:n jo 25 %:n disulfidisidoksista  
20      avauduttua ja samalla liukoisuus-pH-käyrän liukoisuusminimi muuttui.

25      Muuntelureaktiossa proteiini-isolaattien konsentraatio oli 1,0 % ja sulfiitin 0,1 M, urean 4 M sekä pH 7,0 ja lämpötila 25 °C. Hapettimena käytettiin liuoksen läpi pu-  
hallettua happea ja katalysaattorina CuSO<sub>4</sub>:a liuotettuna 800 mM konsentraatioon. Eriasteisesti muunnellut proteiini-isolaatit eristettiin saostamalla ammoniumsulfa-  
tilla, jota lisättiin liuokseen niin paljon, että siitä muodostui 50-prosenttisesti kylläs-  
tetty. Muuttuneita liukoisuusominaisuksia ei käytetty hyväksi proteiinien eristämi-  
sessä.

30      Julkaisussa Gonzalez, J. M., Damodaran, S., J. Food Sci., 55 (1990), no 6, 1559-  
1563, käytettiin oksidatiivista sulfitolyyssä tarkoituksena eristää sellaisen makean  
raakaheran proteiineja, jonka proteiinipitoisuus oli noin 0,6 %, lähes samoissa koe-  
olosuhteissa kuin edellä; pH 7,0, sulfiittikonsentraatio 0,1 M, lämpötila 25 °C sekä  
hapettimena happi ja katalysaattorina Cu<sup>2+</sup>-ioni CuCO<sub>3</sub>:na, mutta tässä tapauksessa  
35      kiinteinä helminä ja pakattuna lasikoloniin. Sulfitolyyzin tuote hapetettiin sulfo-  
naattijohdannaiseksi kierrättämällä sitä mainituilla helmillä täytetyssä kolonnissa.  
Sen jälkeen helmien jäähnökset poistettiin nestemäisestä reaktioseoksesta sentrifu-  
goimalla. Tekijät osoittivat, että pelkällä sulfitolyyssillä eli 0,1 M:n sulfiittilisäyksen

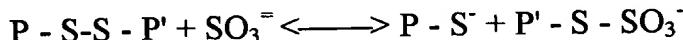
jälkeen edellä kuvatuissa olosuhteissa vain noin 0,4 moolia disulfidi- ja sulfhydryyliyhmiä 43000 grammamoolia proteiinia kohti sulfonoiutui 30 minuutissa, ja senkin oletettiin johtuneen heran luontaisesta hapetuskyvystä. Vastaavissa olosuhteissa hapetettaessa hapella katalysaattorin avulla noin 1,5 moolia disulfidi- ja sulfhydryyliyhmiä sulfonoiutui 3 minuutissa ja noin 2,3 moolia 30 minuutissa. Sulfonoidut ja kuparin kanssa kelatoituneet proteiinit eristettiin toiminnallisina saostamalla pH:ssa 4,5. Ennen saostamista liuoksesta jouduttiin kuitenkin poistamaan sulfonoiutun heran proteiiniin kelatoitunut kupari EDTA-käsittelyllä.

10 Tässä oli kysymyksessä monimutkainen laboratoriomittakaavan toteutus konsentroimattomalla heraproteiinilla. Siinä ei voitu hyödyntää korotetun lämpötilan reaktiota nopeuttavaa vaikutusta, koska hapen liukoisuus ja siten sen pitoisuus liuoksesssa pienenee niin, että se on reaktiota rajoittava tekijä. Lisäksi elektrolyyttien runsas mukanaolo vielä rajoittaa hapen liukoisuutta ja siten myös happipitoisuutta.

15 20 Oksidatiivista sulfitolyyysiä (Kella, N. K. D., et al., J. Agr. Food Chem., 37 (1989), 1203-1210) on käytetty soijaproteiinien, esimerkiksi glysiinin, jaotteluun/fraktiointiin pienemmiksi alayksiköiksi. Glysiini koostuu useasta alayksiköstä, jotka ovat puolestaan muodostuneet kahdesta polypeptidistä. Polypeptidit ovat kiinnittyneet toisiinsa yhdellä disulfidisidoksella, joten aukaisemalla disulfidisidoksia oksidatiivisella sulfitolyyssillä proteiini on jaoteltavissa pienempiin osiin, mikä vaikuttaa puolestaan toiminnallisiin ominaisuuksiin mm. emulgoituvuuteen, geeliyytyvyyteen ja vaahtoutuvuuteen kuten Petracelli, S. ja Anón, M. C., J. Agric. Food Chem., 43 (1995), 2001-2006, ovat osoittaneet.

25 30 35 Sulfitolyysiä on myös käytetty soijan biologisesti aktiivisen proteiinin, trypsiini-inhibiittorin rakenteen/konformaation muunteluun siten, että ihmisen ruoansulatukselle haitallisen proteiinin aktiivisuus katoaa. Trypsiini-inhibiittori on inaktivoitavissa kuumentamalla, mutta 1 tunnin kuumennus 75 °C:ssa tai 10 min kuumennus 100 °C:ssa inaktivoi inhibiittorista vain noin 80 %. Kuumennuksen jatkaminen aiheuttaa proteiinin ravintoarvon alentumista. Kuumentamalla yhden tunnin ajan soijajauhoa 700 g 2,1 litrassa 0,5 M Tris-puskuria pH 8,5, jossa on Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>:a 4,78 g (0,03 moolia), trypsiini-inhibiittorin aktiivisuus hävisi kokonaan. Jäännössulfiitin poistamiseen käytettiin dialysointia, joka kesti 3 päivää. Vaihtoehdoksi sulfiitin poistoon suositeltiin proteiinien saostamista isoelektrisessä pisteessä, pH 4,5:ssä, jota käytetään saostukseen soijaisolaatin teollisessa valmistuksessa. Toimenpiteessä hyödynnetään jäljempänä esitetyssä reaktiossa vapautuneen sulfiitin pesemistä pois proteiinin eristyksen yhteydessä.

Trypsiini-inhibiitorin rakenteen/konformaation muuntelun selitettiin perustuvan sulfiitin aiheuttamaan disulfidiryhmän avautumiseen seuraavan kaavan mukaan:



5

Sen jälkeen muodostunut S-sulfonaatti reagoi toisen sulfhydryliryhmän kanssa, joka on jo ollut olemassa tai muodostunut samassa sulfitolyysisissä ja muodostaa sen kanssa uuden disulfidiryhmän eri paikkaan proteiinimolekyyliissä. Samalla vapautuu S-sulfonaattiryhmästä sulfiittia seuraavan kaavan mukaan:

10



15

Kokonaisvaikutus on uuden disulfidiryhmän muodostuminen ja lähes kaiken sulfiitin vapautuminen (Friedman, M. ja Gumbmann, M. R., J. Food Sci. 51 (1986), 1239-1241).

20

Edellä esitetyt sovellutukset, jotka perustuvat oksidatiiviselle sulfitolyysille, eivät joko pyrkineet tarjoamaan ratkaisua eristämiselle, vaan ainoastaan tiettyjen ominaisuuksien muunteluun hera- ja soijaproteiineilla, tai esitetty ratkaisu on niin vaikeasti hyödynnettävissä tuotantomitassa, ettei se ole ollut toteuttamiskelpoinen. Sama koskee sulfitolyysin käyttöä biologisesti aktiivisten proteiinien inaktivointiin ja molekyylirakenteen muunteluun soijalla.

30

FI-patentissa 96266 "Menetelmä heraproteiinien eristämiseksi" ja FI-patentihakemuksessa 944110 "Menetelmä ja laite heraproteiinien eristämiseksi" on kehitetty menetelmä ja prosessi, jossa on pyritty mahdollisimman yksinkertaiseen, toimivaan ja taloudelliseen heran proteiinien eristämiseen ja fraktointiin ja tuottamaan mahdollisimman toiminnallisia proteiineja, joilla on toiminnallisina ominaisuuksina mm. emulgoituvuus, geeliytyvyys ja vaahdotuvuus. Tuotteet on tarkoitettu tasoltaan ihmislähetystä käytettäviksi.

35

Edellä mainitussa suomalaisessa keksinnössä heraproteiinit käytetään 4-16 kertaa konsentroituna, jolloin niiden proteiinipitoisuus on 2-7 paino/tilavuus-%. Oksidatiivinen sulfitolyysi suoritetaan lisäämällä heraproteiinikonsentraatiin sulfiittia sellainen määrä, jolla voidaan säädellä aukaistujen ja sulfonoidujen disulfidisidosten suhdetta disulfidisidosten alkuperäiseen määrään.

Hapetus suoritetaan sulfitolyysin jälkeen sopivalla elintarvikekäyttöön kelpaavalla ja hallittavalla kemiallisella yhdisteellä esimerkiksi CaO<sub>2</sub>:lla, jolloin vältetään hankala hapen ja katalysaattorin käyttö ja siihen liittyvät rajoitukset. Reaktiolämpötilana käytetään 30-55 °C ja reaktio-pH:na 5,0-8,5.

5

Sulfonoidut heraproteiinit ovat saostettavissa alentamalla pH:ta 2,5-5,5:een. Alentamalla pH:ta eri pH-tasoille voidaan heraproteiinista saostaa koostumukseltaan erilaisia fraktioita, joissa on heran pääproteiineja  $\alpha$ -laktalbumiinia, BSA:ta (naudan seerumialbumiinia) ja  $\beta$ -laktoglobuliinia eri suhteissa.

10

Happamessa, saostuksen yhteydessä vapautuvat oksidatiivisessa sulfitolyysissä muodostuneet S-sulfoniryhmät sekä jäljellä oleva sulfiitti muutetaan rikkidioksidiksi, joka puhalletaan pois sopivalla steriilillä kaasulla ja otetaan neutraloimalla talteen uudelleenkäyttöä varten.

15

Saostettu proteiinifraktio erotetaan mikrosuodattamalla sekä konsentroidaan ja pestään ultrasuodattamalla. Tuloksena on proteiinifraktiokonsentraatti, jossa on tietty proteiini-, laktoosi- ja suolapitoisuus. Liukoisena fraktion proteiinit konsentroidaan ja pestään ultrasuodattamalla, minkä tuloksena saadaan halutunlainen proteiinifraktiokonsentraatti.

20

Vaikka edellä esityyssä suomalaisissa keksinnöissä heraproteiinien eristys erilaisina fraktioina yksinkertaistui ja eristys ensimmäistä kertaa toteutettiin aiempaa suuremmassa mittakaavassa ja sen taloudellinen toteuttaminen oli mahdollista, koko eristysprosessissa on vielä monta vaihetta, jotka pidentävät prosessiaikaa ja monimutkaistavat käsittelyä aiheuttaen kustannuksia.

25

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on yksinkertaistaa proteiinien, erityisesti hera- ja soijaproteiinien sekä eräiden muiden proteiinien sulfonoimalla tapahtuva muuntelua ja nopeuttaa fraktointitapahtumaa sekä fraktioiden jatkokäsittelyä. Tämä on saatu aikaan siten kuin on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

30

Esillä olevassa keksinnössä on oivallettu, että proteiinien, kuten hera- tai soijaproteiinien, muuntelussa sulfitolyysi yksistään aiheuttaa jo riittävän disulfidisidosten aukeamisen eikä hapetus ole välttämätön proteiinimolekyylin konformaation muuttamiseksi ja proteiinien saostamiseksi happamissa olosuhteissa. Hapetuksen poisjääminen yksinkertaistaa ja nopeuttaa prosessia ja parantaa sen kannattavuutta. Käytämällä heraproteiinien sulfitolyysin reaktiolämpötilana noin 40-65 °C reaktio no-

peutuu ja reaktiotasapaino siirtyy sulfonioitujen tuotteiden puolelle, jolloin tarvittavan sulfiitin määrä pienenee.

5 Seuraavassa keksintöä kuvataan sovellettuna heraproteiinin muunteluun ja eristämiseen, mutta keksinnön mukainen menetelmä soveltuu käytettäväksi myös muiden proteiinien, kuten soijaproteiinin, käsittelyyn.

10 Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään taloudellisista syistä mahdollisimman korkean proteiinipitoisuuden omaavaa heraproteiinikonsentraattia. Edullisim-  
15 maksia on osoittautunut noin 16-20-kertaa alkuperäiseen heraan näiden konsentroitu heraproteiini. Sen proteiinipitoisuus on 9-12 paino-%.

15 Keksinnön mukaisesti hera- tai soijaproteiinien muuntelu, disulfididisidosten avaami-  
nen ja konformaation muuntelu saadaan aikaan sulfityyliyssillä, jossa sulfiitti-ioni  
reagoi spesifisesti disulfididisidoksen toisen rikin kanssa ja muodostaa S-sulfonaatti-  
johdannaisen. Toinen rikki pelkistyy sulfhydryyliryhmäksi. Käyttökelpoisimpia sul-  
fiitteja ovat liukoiset ja elintarvikelaatuiset natriumsulfiitti, natriumvetysulfiitti sekä  
natriummetabisulfiitti, mutta myös muita voidaan käyttää. Kaikista edellä nimeltä  
mainituista muodostuu reaktio-olosuhteissa valtaosaltaan natrium- ja natriumvety-  
20 sulfiittia. Lopputuotteiden toiminnallisiin ja muihin ominaisuuksiin pystytään vai-  
kuttamaan valmistusprosessin sulfityyliyssillä määrittelemällä sulfiitin määrän suhde  
proteiinissa olevien disulfididisidosten määrään. Heraproteiinien sulfityyliyssissä sopi-  
va sulfiitin määrä on välillä 0,02-0,20 M, edullisesti 0,05-0,10 M.

25 pH:hon perustuvan saostuksen kannalta sulfityyliyssillä sulfonoidut hera- tai soijapro-  
teiinit eivät tarvitse hapetusta ja siten sulfonioinnin jatkaminen niin, että kaikki sulfi-  
tolyyssä vapautuneet sulfhydryyliryhmät sulfonioituisivat, ei ole tarpeen. Oksida-  
tiivinen sulfityyliyssi eli sulfityyliyssi ja hapetus on käyttökelpoinen menetelmä silloin,  
30 kun tilanne ja olosuhteet vaativat aukaistujen disulfididisidosten molempien rikki-  
atomien sulfonointia.

35 Keksinnön mukaisen menetelmän optimoimiseksi on määriteltävä myös sopiva re-  
aktiolämpötila, pH, saostuksissa käytetyt pH:t, pH:n muutoksissa käytetyt hapot ja  
emäkset, muut reagenssit sekä sopivat toimenpiteet ja menetelmät haluttujen omi-  
naisuuksien saamiseksi tuotteille, jotka voivat olla proteiinikonsentraatteja tai suih-  
kekuivattuja jauheita.

Keksinnön erään edullisen suoritusmuodon mukaan sulfitolyyzin lämpötila on 40-65 °C. Sulfitolyyzi tapahtuu pH:ssa 5,5-8,0, edullisesti 6,0-7,0. Reaktioaika on 10-50 min, edullisesti 20-40 min.

5 Edellä mainituilla tekijöillä pystytään vaikuttamaan muunneltujen proteiinien ja fraktioiden toiminnallisiin ominaisuuksiin sekä saostus-pH:lla fraktioiden määrään ja koostumukseen  $\alpha$ -laktalbumiiniin, BSA:han ja  $\beta$ -laktoglobuliiniin nähden.

10 Keksinnön mukaisessa menetelmässä suoritetaan ensin heraproteiinikonsentraatin proteiinien muuntelu sulfitolyyssillä ja sen jälkeen heraproteiinien tietyn osan saostus happamassa pH:ssa. Saostus suoritetaan pH:ssa 1,5-5,5 ja edullisesti pH:ssa 4,0-5,0 ja lämpötilan ollessa tarpeeksi korkea, edullisesti 40-65 °C, edullisimmin välillä 50-60 °C.

15 Sulfolyysillä muunnellut proteiinit voidaan jättää saostamattakin, jolloin saadaan eri asteisesti muunneltuja heran kokonaisproteiineja, joiden proteiinikoostumus on sama kuin herakonsentraatin alkuperäinen koostumus, mutta sen toiminnalliset ominaisuudet ovat muuttuneet muunteluasteesta riippuen.

20 Saostuksessa tai erikseen suoritettavassa toimenpiteessä pH:n ollessa selvästi happamen puolella, pH 1,5-4,5, sulfitolyyssissä muodostuneet sulfoniryhmät ja sulfitolyyssä jäljelle jäänyt sulfiitti vapautuvat rikkidioksidina ja se johdetaan puhaltaalla steriilillä kaasulla, edullisesti ilmallä tai sen typpiseoksella, vastaanottosäiliöön, jossa se otetaan talteen natrium- ja natriumvetysulfiitin seoksena ja on käytetävissä seuraavassa sulfitolyyssä. Vapautunut rikkidioksidei voidaan siis käyttää uudelleen, mikä säästää kyseistä raaka-ainetta eikä prosessi rasita ympäristöä rikkidioksidipäästöillä.

30 Fraktioimattomaksi jätettävän heraproteiininkin pH lasketaan happamen puolelle arvoihin, jossa saadaan vapautetuksi sulfoniryhmät ja jäljelle jäänyt sulfiitti rikkidioksidina, joka puhaltaan edellä kuvatulla tavalla.

35 Haluttaessa saostuksen jälkeen voidaan toteuttaa fraktiointi, jossa saostuma eli saostettu proteiini erotetaan sopivalla menetelmällä, edullisesti mikrosuodattamalla tai sentrifugoimalla, liukoisesta proteiinista. Haluttaessa muunneltuja kokonaisproteiineja erotus jätetään suorittamatta.

Fraktiot pestäään haluttaessa ja konsentroidaan ultrasuodattamalla saostus-pH:ssa tai lähellä sitä. Pesulla tarkoitetaan edullisesti diasuodatusta, jossa pestävään liuokseen tai suspensioon lisätään puhdasta vettä ja sekoituksen jälkeen suodatetaan se pois, jolloin pienimolekyyliä yhdisteitä, kuten suoloja ja laktoosia, poistuu suodoksen 5 mukana. Toimenpidettä voidaan jatkaa niin kauan, kunnes saavutetaan haluttu koostumus, proteiini-, laktoosi- ja suolapitoisuus, käsiteltävälle fraktiolle.

Muunteluaste osoittaa avautuneiden disulfidisidosten määrän. Happamissa olosuhteissa pH 1,5-4,5 vapautuvat sulfitolyyssä muodostuneet sulfoniryhmät, jolloin 10 avautuneesta disulfidiryhmästä jää jäljelle kaksi sulfhydryliryhmää. Lopputuotteena käytettävä muunnettua kokonaisproteiinikonsentraatti ja proteiinifraktiokonsentraatit tai niistä kuivatut jauheet voivat olla tätytä tyyppiä, jolloin vapaita sulfhydryli- 15 ryhmiä voidaan hyödyntää monella tavalla parantuneina toiminnallisina ominaisuuksina, kuten emulgoituvuutena, geeliytyvyytenä, vaahdotuvuutena ja hydrolysoituvuutena/sulavuutena.

Vapaat sulfhydryliryhmät aiheuttavat helposti sopivissa olosuhteissa disulfidiryhmiä avautumista ja syntyneet sulfhydryliryhmät muodostavat toisten sulfhydryli- 20 ryhmien kanssa uusia disulfidiryhmiä, jolloin muodostuu proteiiniverkkoja, jotka muodostavat suspensiassa emulgoivan proteiinikalvon vesipisaran ympärille tai vaahdossa ilmakuplan ympärille tai sopivan vahvan verkoston geelinmuodostusta varten.

Sulfhydryliryhmät ovat hapetettavissa hapettavalla yhdisteellä edullisesti ilman happea, dehydroaskorbiinihapolla ja yleensä elintarvikelaatuissa hapettimilla disulfidisidoksiksi edullisesti pH:ssa 4,5-8,5, edullisimmin pH 6,5-7,5, lämpötilassa 45-75 °C, edullisimmin välillä 50-70 °C ja sekoittamalla suspensiota tai liuosta tehokkaasti niin, että disulfidisidokset muodostuvat eri sulfhydryliryhmien kanssa kuin proteiinin alkuperäisessä konformaatiossa. Lopputuote, muunnettua proteiini- tai 25 proteiinifraktiokonsentraatti tai vastaava jauhe on pH:ltaan korkeampi kuin edellä kuvattu tuote, siinä on vähemmän vapaita sulfhydryliryhmiä ja sillä on muuntelun asteesta johtuvia toiminnallisia ominaisuuksia kuten dispergoituvuus, emulgoituvuus, geeliytyvyys ja hydrolysoituvuus/sulavuus.

35 S-sulfoniryhmistä ja sulfiitista vapautunut ja puhalluksessa mahdollisesti poistumatta jänyt rikkidioksiidi muuttuu pH:n noston yhteydessä sulfiitiiksi ja hapettuu sulfaatiksi reaktorissa puhallettaessa ilmaa ja sekoitettaessa tehokkaasti pH:ssa 4-7,

edullisesti pH 5-6 ja lämpötilassa 45-65 °C, edullisimmin välillä 50-60 °C. Kyseessä on pieni noin 0,01 %:n sulfiittimääärän hapettuminen sulfaatiksi.

Sulfitolyysillä voidaan edellä esitetyn periaatteen mukaan muunnella myös muita proteiineja, kuten soijaproteiineja, esimerkiksi soijaisolaatteja, -konsentraatteja ja -jauhoja, vaikka niiden muuntelu vaatiikin toisenlaiset olosuhteet, jotka ovat riittävät sulfitolyysin tapahtumiselle ja siten disulfidisidosten avautumiselle. Soijaisolaattien muuntelu voidaan suorittaa sulfitolyysillä esimerkiksi seuraavalla tavalla: Soijaisolaatista tehdään 6-10-prosenttinen suspensio veteen. Sulfitolyysissä käytetään sulfiittimäärää 0,02-0,2 M, edullisesti 0,05-0,10 M. Reaktiolämpötila on 60-80 °C, edullisesti välillä 65-75 °C. Sulfitolyysi tapahtuu pH:ssa 5,5-8,0, edullisesti pH:ssa 6,0-7,0. Reaktioaika on 10-50 min edullisesti 20-40 min. Muuntelun jälkeen soijaisolaatti on eristettäväissä ja pestäväissä pH 4,5:ssä, joka on soijaproteiinien isolektrinen piste. Ylimääräinen sulfiitti poistuu pesuveden mukana sitä täydellisemmin mitä useammin pesu tapahtuu; 2-3 kertaa on riittävä. Sulfiitti on otettavissa talteen pesuvesistä alentamalla pH 2:een ja puhaltamalla vapautunut rikkidioksidi vastaanotto-astiaan sulfiitiksi myöhempää käyttöä varten. Tämän jälkeen, kun suurin osa sulfiitista on poistunut, muunnellun soijaisolaatin pH lasketaan 2-3:een, jolloin saostuma liukenee osittain ja sulfitolyysissä muodostuneet S-sulfonaattiryhmät vapautuvat rikkidioksidina näin happamessa ympäristössä. Tarvittaessa rikkidioksidi on puhallettavissa pois tässä vaiheessa. Nostettaessa pH jälleen 4,5:een muodostunut pieni rikkidioksidimäärä muuttuu natriumvetysulfiitiksi ja se on pestäväissä pois.

Sulfitolyysin aikaansaamalla soijaisolaatin muuntelulla voidaan inaktivoida biologisesti aktiivisia proteiineja esimerkiksi trypsiini-inhibiittori sekä parantaa proteiinin toiminnallisia ominaisuuksia vapaiden sulfhydryyliryhmien lisääntymistä muuntelusteen osoittamalla määräällä.

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan heran proteiinien muuntelu, fraktiointi, eristys ja muu käsittely tapahtuu seuraavina jaksoina: Heran proteiinien konsentrointi ultrasuodattamalla, konsentraatin proteiinien rakenteen/konformaation muuntelu sulfitolyysillä, osan muunnelluista proteiineista saostaminen laskemalla pH:ta, happamessa pH:ssa sulfoniryhmistä ja sulfiitista muodostuneen rikkidioksidin puhaltaminen reaktorista sekä talteenotto sulfiittina seuraavaa sulfitolyysiä varten, saostettujen proteiinien erottus liukoisista proteiineista mikrosuodattamalla, saostettujen proteiinien sekä muunnettujen kokonaisproteiinien pesu ja konsentrointi ultrasuodattamalla saostus-pH:ssa tai yleensä happamessa pH:ssa, mikrosuodatuksen suodoksen pesu ja konsentrointi ultrasuodattamalla saostus-pH:ssa tai sen yläpuolel-

la, vaihtoehtoisesti, saostettujen proteiinien konsenraatin, muunneltujen kokonaisproteiinien konsenraatin sekä liukoisten proteiinien konsenraatin vapaiden sulphydryyliryhmien hapetus disulfidiryhmiksi uuteen järjestykseen sekä kaikkien proteiini-5 konsenraattien pesu ja konsentointi ultrasuodattamalla ja lopputuotteiksi saattamien konsenraatteina tai kuivattuina jauheina.

Heran konsentointi aloitetaan mikrosuodatuksella, jolloin herasta poistetaan mahdolliset kaseinihiukkaset, ja vähennetään fosfolipoproteiinien ja bakteerien määrää. Mikrosuodatuksen tuloksenä ultrasuodatus helpottuu. Saatua mikrosuodatuksen 10 suodosta ultrasuodatetaan 6000-30000 D:n kalvoilla proteiinipitoisuuden väkevöimiseksi alkuperäisestä 0,6 %:sta 16-20-kertaiseksi, joka vastaa 9-12 %:n proteiini-5 määrää. Edullinen konsenraatin proteiiniväkevyys on 10-11 %.

Heraproteiinien rakenteen muuntelu tapahtuu sulfitolyyzin avulla, jolloin haluttu osa 15 disulfidisidoksista aukaistaan ja saavutetaan haluttu muunteluaste alkuperäisten disulfidisidosten määrään nähden. Heraproteiinien sulfitolyyysi toteutetaan tässä suoritusmuodossa seuraavalla tavalla:

Heraproteiinikonsenraattia, proteiinipitoisuus esimerkiksi 10 %, otetaan tarvittava 20 määrä reaktoriin, jossa on tehokas sekoitus sekä lämpötilan ja pH:n mittaus ja säätö. Konsenraatin lämpötilaksi säädetään 40-65 °C, edullisesti 50-60 °C. Lämpötilan valintaan vaikuttaa mm. haluttu reaktionopeus, käytetyt kemikaalit sekä eristettäville 25 proteiineille halutut toiminnalliset ja muut ominaisuudet. Vakiolämpöiseen proteiinikonsenraattiin lisätään sulfiittia joko  $\text{NaHSO}_3$ :na,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ :nä tai  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ :na 0,02-0,2 M, esimerkiksi 0,05-0,1 M, ja sekoitetaan tehokkaasti. Lisättävän sulfiitin määrä riippuu mm. proteiinikonsenraatiosta ja halutusta sulfitolyyysiasteesta. pH 30 säädetään välille 5,5-8, edullisesti välille 6-7, esimerkiksi 6,5. pH:n säädössä käytetään elintarvikelaatuisia hoppoja ja emäksiä, kuten  $\text{HCl}$ :ää ja  $\text{NaOH}$ :ta. Reaktioaika, jonka sulfiitti vaikuttaa proteiineihin, on 10-50 min, edullisesti 20-40 min. Aika määräytyy edellä mainittujen tekijöiden yhteisvaikutuksesta halutun muunteluasteen saavuttamiseksi.

35 Proteiinit, halutun muuntelun jälkeen, saostetaan laskemalla pH 1,5-5,5:een, edullisesti 4,0-5,0:aan. Saostuksessa käytettävä pH riippuu pääasiassa fraktioille halutusta proteiinikostumuksesta sekä jonkin verran proteiinien muunteluasteesta.

Saostamiseen käytetty aika on 10-40 min, esimerkiksi 20-30 min. Tietyn asteisesti muunnellut proteiinit voidaan jättää saostamatta, kun halutaan muunneltuja koko-

naisproteiineja, ja pH lasketaan suoraan tarpeksi alas pH 1,5-4,5:een sulfoniryhmi- en ja ylimääräisen sulfiitin vapauttamiseksi rikkidioksidina, joka puhalletaan steriiliä ilmalla tai ilman ja typen seoksella vastaanottosäiliöön natrium- ja natriumve- tysulfiitin seoksena seuraavaa sulfitolyyysiä varten.

5

Saostetut proteiinit erotetaan liukoisista proteiineista mikrosuodattamalla. Muodostuneet jakeet käsitellään erikseen.

10

Fraktioidusta proteiineista, saostettu ja liukoinen fraktio, sulfoniryhmät ja ylimääräinen sulfiitti vapautetaan happamassa pH:ssa rikkidioksidina ja puhalletaan pois reaktioseoksesta, kuten edellä on kuvattu.

15

Muodostuneet jakeet pestäään suolojen ja laktoosin vähentämiseksi ja konsentroidaan vaadittuun proteiinipitoisuuteen sekä laktoosi- ja suolapitoisuuteen happamessa pH:ssa, esimerkiksi 4,5:ssä.

20

Haluttaessa jakeen pH nostetaan 5,5-7,5, esimerkiksi 6,5:een, sen läpi puhalletaan steriloitua ilmaa, jolloin vapaana olevat sulfhydryyliryhmät muodostavat disulfididisoksia alkuperäisestä poikkeaviin kohtiin proteiinimolekyylissä sekoituksen ansiossa. Käsiteltävä fraktio on pestävissä ja konsentroiditavissa ennen pH:n nostoa tai sen jälkeen tai molemmissa vaiheissa.

25

Pestyt, edellä kuvatuilla tavoilla tuotetut konsentraatit saatetaan vaadittuun proteiinipitoisuuteen ja ne ovat käytettävissä jatkosovellutuksiin. Konsentraatit voidaan myös kuivata jauheeksi ja käyttää sellaisenaan jatkosovellutuksiin.

30

Sulfitolyyzin kaikilla tärkeillä muuttujilla eli proteiinikonsentraatin proteiinipitoisuudella, sulfiitin määrellä, reaktiolämpötilalla ja -pH:lla eri vaiheissa sekä eri vaiheissa käytetyillä reaktioajoilla voidaan vaikuttaa eristysprosessin eri osareaktioiden toteutumiseen ja kokonaisuutena koko prosessin lopputulokseen eli eristettävien jakeiden proteiinien määrään, koostumukseen ja haluttuihin ominaisuuksiin.

Seuraavat esimerkit kuvaavat edellä esitettyä keksintöä.

35

### Esimerkki 1

Heraproteiinikonsentraatin valmistukseen käytettiin tuoretta edam-juuston valmisteissa syntynyttä heraa. Sen proteiinipitoisuus oli 0,6 %, joka on saatu kertomalla

Kjeldahl-menetelmällä määritetty proteiinityppi vakiolla 6,38. Hera mikrosuodatettiin ensin 0,45  $\mu\text{m}$ :n suodatinkalvoilla Millipore Pellicon -laboratoriolaitteistolla. Mikrosuodatuksen suodos konsentroitiin suodattamalla se samalla laitteistolla 10000 D:n ultrasuodatuskalvoilla niin, että konsentraattien proteiinipitoisuudet vaihtelivat 5 8 -12 %:n välillä.

Muuntelua ja fraktointia varten otettiin 0,5 l 8,5-paino/tilavuusprosentista herakonsentraattia 1,0 l:n lasiastiaan. Se asetettiin lämpötilaltaan säädettävään vesihauteseen ja sen sisältöä sekoitettiin tehokkaalla sekoittimella. Konsentraatin lämpötilaksi 10 säädettiin 45°C.

Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 2,4 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (natriummetabisulfiittia) ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin ja reaktio sai jatkua 30 min. Tämän jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostettiin laskemalla pH 4,8:aan lisäämällä seokseen HCl:ää. Saostumaa sisältävää seosta sekoitettiin vielä 15 min. Saostuma erotettiin sentrifugoimalla Sorvall RC-5B -sentrifugilla 10000 kierr./min 30 min. Saostuneet proteiinit erottuivat hyvin ja saatu liukoinen osa oli kirkasta. Liukoisesta osasta eli kirkasteesta määritettiin proteiinipitoisuus. Alkuperäisen proteiinikonsentraatin ja kirkasteen proteiinipitoisuksien ero 15 tuksena voitiin laskea, ottamalla huomioon suorituksen aikana tapahtunut laimentuminen, proteiinien jakautuminen saostuneeseen ja liukoiseen osaan kokonaisproteiiniin nähden. Tässä tapauksessa saostuneen proteiinin osuus oli 21 % ja liukoisesta 20 vastaavasti 79 %.

## 25 Esimerkki 2

Muuntelua ja fraktointia varten otettiin 0,5 l 10,5-prosenttista edellä kuvatulla tavalla suodattamalla konsentroitua heraproteiinikonsentraattia 1,0 l:n lasiastiaan. Konsentraatin lämpötilaksi säädettiin 50 °C ja sekoitettiin tehokkaasti. Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 2,4 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta.

Seosta sekoitettiin edelleen ja reaktio sai jatkua 30 min. Tämän jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostettiin laskemalla pH 5,3:een lisäämällä seokseen HCl:ää. Saostumaa sisältävää seosta sekoitettiin vielä 15 min. Saostuma erotettiin sentrifugoimalla 10000 kierr./min. 30 min. Saostuneen proteiinin osuus oli 16 / ja liukoisesta 35 vastaavasti 84 %.

**Esimerkki 3**

Muuntelua ja fraktiointia varten otettiin 0,5 l 10,5-prosenttista edellisessä esimerkis-  
 sää käytettyä heraproteiinikonsentraattia 1,0 l:n lasiastiaan. Konsentraatin lämpöti-  
 laksi säädettiin 55 °C ja sitä sekoitettiin tehokkaasti. Sulfitolyysi suoritettiin lisää-  
 mällä proteiinikonsentraattiin 2,4 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan  
 lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin koko ajan ja reaktio sai jatkua 30 min. Tä-  
 män jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostettiin laskemalla pH 4,8:aan lisää-  
 mällä seokseen HCl:ää. Saostumaa sisältävä seosta sekoitettiin vielä 15 min. Saos-  
 tuma erotettiin sentrifugoimalla 10000 kierr./min. 30 min. Saostuneen proteiinin  
 osuus oli 26 % ja liukoisena vastaavasti 74 %.

**Esimerkki 4**

Muuntelua ja fraktiointia varten otettiin 0,45 l 9,0-prosenttista heraproteiinikonsent-  
 traattia 1,0 l:n lasiastiaan. Heraproteiinikonsentraatti oli laimennettu teollisesti dia-  
 suodatuksella tuotetusta 16-prosenttista konsentraatista, joka oli ennen laimentamis-  
 ta mikrosuodatettu 0,45 µm:n kalvolla Millipore Prostak -laitteistolla mahdollisten  
 kaseiinihiukkasten poistamiseksi ja lipoproteiinien vähentämiseksi. Konsentraatin  
 lämpötilaksi säädettiin 55 °C ja sitä sekoitettiin tehokkaasti.

Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 3,25 g natriummetabi-  
 sulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin koko ajan  
 ja reaktio sai jatkua 30 min. Tämän jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostet-  
 tiin laskemalla pH ensin 5,3:aan ja sen jälkeen 4,8 lisäämällä seokseen HCl:ää. Sa-  
 ostumaa sisältävä seosta sekoitettiin pH:n laskun jälkeen vielä 15 min ennen näyt-  
 teenottoa. Saostumat erotettiin sentrifugoimalla 10000 kierr./min. 30 min. Saostuneen  
 proteiinin osuus pH 5,3:ssa oli 39 % ja liukoisena 61 %. Vastaavat luvut pH  
 4,8:ssa olivat 46 % ja 54 %.

Geelielektroforeesimääritykset osoittivat, että pH 5,3:ssa fraktoidussa liukoisessa  
 osassa oli vielä vähän BSA:ta (naudan seerumialbumiinia) mukana β-laktoglobulii-  
 nin lisänä, mutta pH 4,8:ssa BSA:ta ei enää ollut, vaan β-laktoglobuliinia pelkäs-  
 tään.

### Esimerkki 5

Muuntelua ja fraktiointia varten otettiin 0,5 l 8,57-prosenttista herakonsentraattia 1,0 l:n lasiastiaan. Konsentraatin lämpötilaksi säädettiin 60 °C ja sekoitettiin tehokkaasti. Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 4,8 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin ja reaktio sai jatkua 30 min. Tämän jälkeen osa muunnellista proteiineista saostettiin laskemalla pH 4,5:een lisäämällä seokseen HCl:ää. Saostumaa sisältävä seosta sekoitettiin vielä 15 min. Saostuma erotettiin sentrifugoimalla 10000 kierr./min. 30 min. Saostuneen proteiinin osuus oli 66 % ja liukoisena vastaavasti 34 %.

### Esimerkki 6

15 l:n reaktoriin, jossa oli sekoitus, lämpötilan ja pH:n säätö sekä kaasun puhallusmahdollisuus reaktorin pohjalta, otettiin laboratoriolaitteilla mikrosuodatettua ja ultrasuodatuksella konsentroitua 11,1-prosenttista heraproteiinikonsentraattia 9,0 l heraproteiinin muuntelua varten. Konsentraatin lämpötila säädettiin 55 °C:een ja sitä sekoitettiin tehokkaasti.

20 Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 63 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin ja reaktion annettiin jatkua 30 min. Tämän jälkeen muunnellun proteiinikonsentraatin pH laskettiin lisäämällä HCl:ää ja sekoittaen 2,0:aan, jossa sulfiitista suurin osa on tasa-painoreaktion osana rikkidioksidina sekä muunteluasteen osoittamiin määriin disulfididoksia muodostuneet S-sulfonaattiryhmät ovat vapautuneet myös rikkidioksidina. Sekoitusta jatkettiin 15 min. Rikkidioksidin poistamiseksi puhallettiin reaktoriin steriloitua ilmaa 3 l/min noin tunnin ajan samalla sekoittaen tehokkaasti, jolloin rikkidioksi poistui puhalletun ilman ja vesihöyryyn mukana. Rikkidioksidipitoinen ilma otettiin vastaanottoastiaan, jossa se pH 7,0:ssa liuotettiin veteen ja neuraloitiin natrium- ja natriumvetysulfiitin seokseksi. Tämän jälkeen muunnellun proteiinikonsentraatin pH nostetaan 5,0:aan ja mahdollisesti rikkidioksidin poistopuhalluksen jälkeenkin jäänyt pieni sulfiittimäärä hapetettiin sulfaatiksi puhaltamalla steriliä ilmaa reaktoriin edellä kuvatulla tavalla ja samalla sekoittaen noin 30 min ajan.

35 Tämän jälkeen muunnettua proteiinikonsentraatti pestiin diasuodattamalla 10000 D -ultrasuodatuskalvoilla kolme kertaa omalla tilavuudellaan vettä, jolloin laktoosin ja suolojen määrä väheni yhteen kolmasosaan. Saatu muunnettua proteiinikonsentraatti on koostumukseltaan alkuperäisen kaltainen, mutta sen toiminnalliset ominaisuudet

ovat muuttuneet, mm. sen pепсиини hydrolysoituvuus (hydrolyysinopeus) on alkuperäiseen konsentraattiin nähden 2,2-kertainen kolmen tunnin aikana

### Esimerkki 7

5

Esimerkissä 4 mainittua 9,0-prosenttista heraproteiinikonsentraattia otettiin esimerkissä 6 mainittuun reaktoriin 7,0 l muuntelua ja fraktointia varten. Konsentraatin lämpötila säädettiin 55°:een ja sekoitettiin tehokkaasti.

10

Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 32 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan NaOH:lla. Seosta sekoitettiin ja reaktion annettiin edetä 30 min. Tämän jälkeen osa proteiinikonsentraatin muunnelluista proteiineista saostettiin laskemalla pH 4,5:een HCl:llä. Saostumaa sisältävä seosta sekoitettiin vielä 15 min saostuneen ja liukoisien proteiinien määrän tasapainottumiseksi. Saostuneet proteiinit erotettiin saostuksen jälkeen suodattamalla 0,45  $\mu$ m:n mikrosuodatuskalvoilla ja pestiin kerran omalla tilavuudellaan vettä. Suodos otettiin talteen ja käytettiin mikrosuodatuksen suodoksen eli liukoisien osan ensimmäisenä pesuvetenä.

15

Saostuman pH laskettiin HCl:llä 2,0:aan ja vapautunut rikkidioksidi puhallettiin pois ja sen jälkeen pH nostettiin 5,0:aan ja puhallettiin uudelleen pienen sulfiittijäämän hapettamiseksi sulfaatiksi, kuten esimerkissä 6 on kuvattu. Lopuksi tämä fraktio pestiin ultrasuodattamalla laktoosin ja suolojen vähentämiseksi sekä konsentroitiin 10 %:n proteiinipitoisuuteen.

25

Liukoisesta osasta poistettiin sulfiitti- ja S-sulfoniryhmät kuten edellä tehtiin saostuneen osan kohdalla. Sen jälkeen pH nostettiin 4,5:een ja pestiin ultrasuodattamalla ensin mikrosuodatuksen pesuvedellä ja sitten kaksi kertaa vedellä ja konsentroitiin 15 %:n proteiinipitoisuuteen.

30

### Esimerkki 8

Soijaproteiinin muuntelua varten sekoitettiin 70 g isolaattia 1,0 l:aan vettä 2 l:n lasiastiassa. Soijaisolaatin proteiinipitoisuus oli noin 85 %. Suspension lämpötilaksi säädettiin 70 °C ja sitä sekoitettiin tehokkaasti.

35

Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä isolaattisuspensioon 9,5 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,5:een NaOH:lla. Reaktioaika oli 30 min ja koko ajan suspensiota sekoitettiin tehokkaasti.

Muuntelun jälkeen suspension pH laskettiin 4,5:een, jolloin soijan proteiinit saostuvat. Saostuma sentrifugoitiin 10000 kierr./min. 30 min, jolloin proteiinisaostuma jää putken pohjalle ja kirkkaaseen vesikerrokseen, kirkasteesseen jäivät suolat mm. sulfiitti sekä vähän proteiinia (noin 0,5 %). Kahden pesukerran jälkeen suolojen määärä pieneni olennaisesti, mutta näissä pesuvesissä proteiinia oli vain nimeksi. Pesujen jälkeen pH laskettiin 2,5:een ja pidettiin siellä 15 min samalla sekoittaen.

pH nostettiin uudelleen 4,5:een, jossa saostuma pestiin vielä kerran ja alkuperäiseen konsentraatioon liuotetun proteiinin pH nostettiin 6,0:aan. Tämä oli lopputuote, josta tehtiin trypsiini-inhibiittorin aktiivisuuden määritys sekä geelielektroforeesimääritys proteiinin molekyylikoon jakautumisesta. Trypsiini-inhibiittorin aktiivisuus määritettiin menetelmällä, joka on esitetty julkaisussa Kakade, M. L., Rackis, J. J., McGhee, J. E. ja Puski, G., Cereal Chem. 51 (1974), 376-382.

Määritystulosten mukaan muunnettu soijaisolaattiproteiini oli menettänyt kokonaan trypsiini-inhibiittoriaktiivisuutensa, mutta vertailuna käytetyssä alkuperäisessä isolaattiproteiinissa aktiivisuutta oli menetelmässä käytetyn laimennussarjan väkevimmässä ja toiseksi väkevimmässä näytteessä selvästi ja kolmannessa havaittavasti. Geelielektroforesimääritys osoitti vertailtaessa alkuperäisen soijaisolaatin ja muunnellun isolaatin proteiinimolekyylien jakautumaa, että muunnellussa isolaatissa molekyylipainoltaan pienempien proteiinien eli isompien proteiinien osaproteiinien määärä oli selvästi lisääntynyt.

Edellä on esitetty eräitä keksinnön sovelluksia. Keksintöä luonnollisesti ei rajoiteta edellä esitettyihin esimerkkeihin, vaan keksinnön mukaista periaatetta voidaan muunnella patenttivaatimusten suoja-alan puitteissa.

**Patenttivaatimukset**

1. Menetelmä proteiinin, erityisesti hera- tai soijaproteiinien, muuntemiseksi ja eristämiseksi, **tunnettua siitä**, että
  - 5 a) saatetaan proteiini, kuten hera tai soija tai sen konsentraatti, kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonointiseksi ilman hapetinta, ja
    - b) saostetaan sulfonointu proteiini happamassa pH:ssa, ja
    - c) otetaan sulfonointu proteiini tai saostunut ja/tai liukoinen sulfonointu proteiini talteen ja suoritetaan sille mahdollinen jälkikäsittely.
- 10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettua siitä**, että hera tai sen konsentraatti saatetaan kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonointiseksi lämpötilassa 40-65 °C, edullisesti 50-60 °C.
- 15 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettua siitä**, että herakonsentraatin proteiinipitoisuus on 9-12 paino-%.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettua siitä**, että soija tai sen konsentraatti saatetaan kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonointiseksi lämpötilassa 60-80 °C, edullisesti 65-75 °C.
- 20 5. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3 tai 4 mukainen menetelmä, **tunnettua siitä**, että kohdassa (a) pH säädetään arvoon 5,5-8, edullisesti 6-7.
- 25 6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen menetelmä, **tunnettua siitä**, että kohdan (a) sulfonioinnissa käytetään sulfiittia 0,02-0,20 M, edullisesti 0,05-0,10 M.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettua siitä**, että proteiinin sulfonioitumisasteseen vaikutetaan reaktio-olosuhteita ja reagenssien määrää muuttamalla.
- 30 8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettua siitä**, että sulfonoidut proteiinit saostetaan koostumukseltaan erilaisina fraktioina pH-arvoa säätelemällä.
- 35 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, **tunnettua siitä**, että sulfonoidut proteiinit saostetaan laskemalla pH arvoon 1,5-5,5, edullisesti arvoon 4,0-5,0.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että sulfonoiduista proteiineista tai saostuneesta ja/tai liukoisesta sulfonoidusta proteiinista poistetaan sulfoniryhmät sekä samasta liuoksesta sulfiitit laskemalla pH noin 1,5-4:ään, jolloin molemmat vapautuvat rikkidioksidina ja proteiiniin muodostuu vapaita sulfhydryyli-  
5 ryhmiä.

11. Patenttivaatimuksen 1 tai 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että **jäljelle** jäänyt sulfiitti hapetetaan sulfaatiksi puhaltamalla ilmaa seokseen pH:ssa 4-7.

10 12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vapaista sulfhydryyliryhmistä muodostetaan uudelleen disulfidiryhmiä puhaltamalla ilmaa proteiiniseokseen, jonka pH on 4,5-8,5 ja lämpötila 45-75 °C.

**(57) Tiivistelmä**

Keksintö koskee menetelmää proteiinien eristämiseksi herasta tai soijasta ja eristettyjen proteiinien muuntelemiseksi, jossa menetelmässä

- a) saatetaan hera tai soija tai sen konsentraatti kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonoimiseksi, ja valinnaisesti
- b) saostetaan sulfonoitu proteiini happamassa pH:ssa, ja
- c) otetaan sulfonoitu proteiini tai saostunut ja liukoinen sulfonoitu proteiini talteen ja suoritetaan sille mahdollinen jälkikäsittely.

09674034

4

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

REC'D 28 SEP 2000

WIPO

PCT

Applicant's or agent's file reference 47440/IR/MG	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FI99/00347	International filing date (day/month/year) 28.04.1999	Priority date (day/month/year) 29.04.1998
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC7 A 23 J 1/20, A 23 J 3/08, A 23 C 9/00, A 23 C 21/00		
Applicant Savolainen Jouko		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16.11.1999	Date of completion of this report 05.09.2000	
Name and mailing address of the IPEA/SE Patent- och registreringsverket Box 5055 S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. 08-667 72 88	Telex 17978 PATOREG-S	Authorized officer Eva Johansson/gh Telephone No. 08-782 25 00

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages \_\_\_\_\_, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages \_\_\_\_\_  
 the claims, Nos. \_\_\_\_\_  
 the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

## V. Resoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims Claims	1-12 _____	YES NO
Inventive step (IS)	Claims Claims	1-12 _____	YES NO
Industrial applicability (IA)	Claims Claims	1-12 _____	YES NO

## 2. Citations and explanations

The claimed invention relates to a method for modification of and isolation of a protein, especially whey or soy protein. The method is characterised in that a protein is brought into contact with a reagent that forms sulfite ions in order to sulfonate the protein without using an oxidising agent and the sulfonated protein is precipitated at an acid pH and then recovered and optionally further processed.

The following documents are cited in the search report:

- A) WO 9522907 A1 (Sävolainen, Jouko), 31 August 1995 (31.08.95)
- B) J. Agric. Food Chem., Volume 43, 1995 Silvana Petruccelli et al, "Partial Reduction of Soy Protein Isolate Disulfide Bonds" page 2001 - 2006
- C) Journal of Agricultural and Food Chemistry, Volume 37, No 5, 1989, Navin K.D. Kella et al, "Effect of Disulfide Bond Cleavage on Structural and Interfacial Properties of Whey Proteins" page 1203 - 1210
- D) Journal of Food Science, Volume 55, No 6, 1990, Juan M. Gonzalez et al, "Recovery of Protein from Raw Sweet Whey Using a Solide State Sulfitolysis" page 2 - page 6

The most relevant document A) relates to a method for isolating protein from whey, wherein a) whey and a reagent which forms sulfite ions and an oxidant are brought into contact to sulfonate, i.e. sulfitolysis and oxidise the whey protein, b) the sulfitolysed and oxidised whey protein is precipitated out from the whey at an acid pH and then recovered.

.../...

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: V

The claimed invention differs from the known method in document A) in that there is no oxidation step in the claimed process and that after sulfonation the whey protein can be precipitated by lowering the pH to an acidic level.

It has been shown that the sulfonation of the protein can be accomplished by the sulfitolysis alone, and from reading the cited documents, it would not be obvious to a person skilled in the art to sulfonate the protein with the claimed method.

Thus, the claimed invention is considered to fulfil the requirements of novelty, inventive step and industrial applicability.

Documents B), C) and D) relate to the general state of art and are not considered being of particular relevance.

## ENT COOPERATION TRE,

## From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

**NOTIFICATION OF ELECTION**  
(PCT Rule 61.2)

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 11 January 2000 (11.01.00)	in its capacity as elected Office
<b>International application No.</b> PCT/FI99/00347	<b>Applicant's or agent's file reference</b> 47440
<b>International filing date (day/month/year)</b> 28 April 1999 (28.04.99)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 29 April 1998 (29.04.98)
<b>Applicant</b>	
SAVOLAINEN, Jouko	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

16 November 1999 (16.11.99)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<p><b>The International Bureau of WIPO</b>  <b>34, chemin des Colombettes</b>  <b>1211 Geneva 20, Switzerland</b></p> <p>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35</p>	<p><b>Authorized officer</b></p> <p><b>C. Cupello</b></p> <p>Telephone No.: (41-22) 338.83.38</p>
---	---